



# Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

[www.bjorl.org](http://www.bjorl.org)



## ARTIGO ORIGINAL

# Effect of sublingual immunotherapy on platelet activity in children with allergic rhinitis<sup>☆</sup>



Yanqiu Chen<sup>a</sup>, Lifeng Zhou<sup>a,\*</sup> e Yan Yang<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Guangzhou Medical College, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Department of Otolaryngology, Guangzhou, China

<sup>b</sup> Sun Yat-sen University (Northern Campus), School of Public Health, Department of Nutrition, Guangzhou, China

Recebido em 16 de novembro de 2015; aceito em 2 de março de 2016

Disponível na Internet em 17 de fevereiro de 2017

### KEYWORDS

Allergic rhinitis;  
Platelet activation;  
Sublingual  
immunotherapy;  
Platelet Factor-4;  
Beta-  
Thromboglobulin

### Abstract

**Introduction:** The role of platelet activation in allergic inflammation is receiving increasing attention. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis can modify the immunological process to an allergen, rather than simply treating symptoms.

**Objective:** The aim of this study was to explore the role of platelet activation during sublingual immunotherapy in children with allergic rhinitis.

**Methods:** Forty-two House Dust Mite – sensitized children with allergic rhinitis were enrolled and received House Dust Mite allergen extract for sublingual immunotherapy or placebo. Serum of different time points during treatment was collected and used for detection of Platelet Factor-4 and Beta-Thromboglobulin concentration by Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay.

**Results:** Our data showed decreased expression of Platelet Factor-4 and Beta-Thromboglobulin protein after one year's sublingual immunotherapy. In addition, the decrease of symptom scores and serum Platelet Factor-4 and Beta-Thromboglobulin protein concentrations was positively related.

**Conclusion:** During sublingual immunotherapy, platelet activation was inhibited significantly. Our results might indicate that inhibition of platelet activation within the systemic circulation is an important mechanism during sublingual immunotherapy.

© 2017 Published by Elsevier Editora Ltda. on behalf of Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2016.03.006>

<sup>☆</sup> Como citar este artigo: Chen Y, Zhou L, Yang Y. Effect of sublingual immunotherapy on platelet activity in children with allergic rhinitis. Braz J Otorhinolaryngol. 2017;83:190–4.

\* Autores para correspondência.

E-mails: [Lifengzhou@163.com](mailto:Lifengzhou@163.com) (L. Zhou), [yangyan3@163.com](mailto:yangyan3@163.com) (Y. Yang).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

2530-0539/© 2017 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**PALAVRAS-CHAVE**

Rinite alérgica;  
Ativação plaquetária;  
Imunoterapia  
sublingual;  
Fator 4 plaquetário;  
Beta-tromboglobulina

**Efeito da imunoterapia sublingual sobre a atividade plaquetária em crianças com rinite alérgica****Resumo**

**Introdução:** O papel da ativação de plaquetas na inflamação alérgica recebeu atenção crescente. A imunoterapia sublingual para rinite alérgica pode modificar o processo imunológico a um alérgeno, em vez de tratar os sintomas simplesmente.

**Objetivo:** Explorar o papel da ativação plaquetária durante a imunoterapia sublingual em crianças com rinite alérgica.

**Método:** Quarenta e duas crianças com rinite alérgica sensibilizadas por ácaros de poeira domiciliar (APD) foram inscritas e receberam extrato de alérgeno de APD para imunoterapia sublingual ou placebo. O soro de diferentes pontos no tempo durante o tratamento foi recolhido e usado para a detecção de fator 4 plaquetário e concentração de beta-tromboglobulina por ensaio imunoenzimático.

**Resultados:** Nossos dados mostraram diminuição da expressão de fator 4 plaquetário e proteína beta-tromboglobulina após imunoterapia sublingual de um ano. Além disso, a diminuição dos escores de sintomas e o fator 4 plaquetário sérico e concentrações de proteína beta-tromboglobulina foram relacionados de maneira positiva.

**Conclusão:** Durante imunoterapia sublingual, a ativação plaquetária foi inibida significativamente. Os nossos resultados podem indicar que a inibição da ativação de plaquetas dentro da circulação sistêmica é um mecanismo importante durante imunoterapia sublingual.

© 2017 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Introdução**

A imunoterapia sublingual (ITSL) é o único tratamento que regula o processo imunológico durante o desenvolvimento da rinite alérgica (RA), e não simplesmente trata os sintomas.<sup>1,2</sup> No entanto, os mecanismos subjacentes do processo e os biomarcadores potenciais ainda não estão completamente caracterizados.

A ativação plaquetária ocorre durante as reações das vias aéreas induzidas pelo antígeno em indivíduos alérgicos e asmáticos. Níveis elevados de mediadores derivados das plaquetas, tais como as quimiocinas, beta-tromboglobulina (BTG) e fator 4 plaquetário (F4P), são observados no plasma e no líquido de lavagem broncoalveolar de indivíduos atópicos. Esses mediadores têm a capacidade de ativar os eosinófilos, aumentar a expressão dos receptores de Fc-IgG e Fc-IgE, estimular basófilos para liberar histamina e assim por diante.<sup>3-6</sup> Como a ITSL pode inibir significativamente a inflamação alérgica, supomos que a ITSL seja capaz afetar a ativação de plaquetas em crianças com RA.

No presente estudo, buscamos esclarecer o efeito de ITLS na ativação plaquetária de crianças com RA por meio da detecção de mudanças de F4P sérico e concentração de BTG.

**Método****Pacientes**

Foram recrutadas 42 crianças, entre 6 e 12 anos, com história clínica de RA induzida por ácaros da poeira domiciliar (APD) por pelo menos um ano. O teste cutâneo de

hipersensibilidade imediata (TCHI) foi feito para examinar crianças alérgicas a APD. Aquelas com doenças crônicas (p.ex., asma, desnutrição, malformações anatômicas do sistema respiratório, doença pulmonar crônica, doença cardíaca, doença de refluxo gastroesofágico, fibrose cística) e aquelas com um histórico de uso crônico de fármacos (p.ex., corticosteroides orais ou nasais, antiepiléticos, imunossupressores) foram excluídas. O estudo foi feito com a aprovação do comitê de ética local e com o consentimento informado por escrito dos pais.

**Imunoterapia sublingual e agrupamento**

O extrato de alérgeno do APD para ITSL foi fabricado por Wolwopharma Biotecnologia Company (Zhejiang, China) e usado sob a forma de gotas (n° 1, 1 mg/mL; n° 2, 10 mg/mL; n° 3, 100 mg/mL e n° 4, 333 mg/mL). De acordo com as instruções do fabricante, os pacientes foram orientados a tomar doses crescentes (de n° 1 a n° 3) durante as três primeiras semanas da fase de dosagem crescente e depois foram instruídos a tomar 3 gotas de solução n° 4 uma vez por dia, durante a fase de manutenção. Havia instruções para que as gotas fossem mantidas sob a língua por 2 a 3 minutos, antes de ser engolidas. As crianças no grupo do placebo receberam diluentes com 50% glicerol e 50% tampão de solução salina. Todas as crianças foram agrupadas como ITLS (21 crianças) e grupo placebo (21 crianças) aleatoriamente. Os fármacos foram rotulados com números de código dos pacientes, que foram designados pelo pesquisador de maneira randomizada sequencial, com um número de código de estudo. Os frascos individuais

do fármaco tiveram a identidade mascarada, para que os pacientes e os pesquisadores não tivessem conhecimento do tratamento atribuído. O mascaramento do estudo foi preservado até que todos os indivíduos completassem o estudo. A adesão ao uso dos medicamentos foi avaliada tanto pelo questionário para os pais como por medição de peso de fármaco administrado a cada duas semanas.

### Escores de sintomas

Os sintomas nasais (nariz escorrendo, espirros, nariz entupido, coceira no nariz) foram marcados pelas crianças com a ajuda dos pais. Um escore de 0 foi definido como nenhum sintoma, um escore de 1 foi definido como sintomas leves (que não interferem em qualquer atividade), um escore de 2 foi definido como sintomas moderados (ligeiramente incômodos que pouco interferem na atividade/sono noturno) e um escore de 3 foi definido como sintomas graves (incômodos que interferem na atividade/sono noturno).<sup>7,8</sup> Os escores foram registrados a cada manhã, diariamente, por pelo menos 12 semanas e, em seguida, fez-se a média.

### Preparação e análise de amostras de sangue

As amostras de sangue de crianças foram coletadas entre 11 e 14h pelo método de venopunção em condições apropriadas. O soro foi separado após a coagulação do sangue durante 1-2 horas à temperatura ambiente e centrifugado a 3.000g durante 15 minutos a 4°C. As amostras de soro foram armazenadas a -80°C e usadas para o ensaio imunoenzimático (Elisa). A concentração total de proteínas foi determinada com ensaios de proteína Bio-Rad, de acordo com Bradford. Os kits de Elisa (Diagnostic Stago, França) foram usados para medir o F4P sérico e as concentrações de BTG.

### Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média ± DP. As significâncias estatísticas entre os diferentes grupos foram determinadas por meio do teste U não paramétrico de Mann-Whitney. O teste de correlação de Spearman foi usado para analisar a correlação entre o escore de sintomas e a concentração de F4P ou BTG;  $p < 0,05$  foi considerado como diferença significativa.

## Resultados

### Características demográficas da população do estudo e evolução clínica

Este estudo foi feito com 42 crianças, 21 incluídas no grupo ITSL, entre 72 e 144 meses (idade média:  $120,7 \pm 44,0$  meses, dez do sexo masculino) e 21 incluídas no grupo de placebo, entre 75 e 141 meses (idade média:  $123,0 \pm 42,3$  meses, 11 homens). Idade, sexo, duração da doença e escores de sintomas de base entre dois grupos foram comparáveis, sem significância. O tratamento de ITLS foi eficaz e os escores de sintomas diminuíram significativamente em

**Tabela 1** Característica demográfica de 42 crianças com RA

|                                | Grupo ITLS          | Grupo placebo    |
|--------------------------------|---------------------|------------------|
| Número                         | 21                  | 21               |
| Sexo (Masculino/Feminino)      | 10/11               | 11/10            |
| Idade (meses)                  | $120,7 \pm 44,0$    | $123,0 \pm 42,3$ |
| Duração da doença (ano)        | $5,2 \pm 2,4$       | $6,1 \pm 3,7$    |
| IgE Total (kU/L)               | $465 \pm 226$       | $513 \pm 316$    |
| IgE específico de APD (kU/L)   | $45 \pm 21$         | $35 \pm 18$      |
| <b>Sintomas basais</b>         |                     |                  |
| Nariz escorrendo               | $2,5 \pm 0,3$       | $2,1 \pm 0,2$    |
| Espirros                       | $1,9 \pm 0,1$       | $1,7 \pm 0,1$    |
| Nariz entupido                 | $2,1 \pm 0,2$       | $1,8 \pm 0,3$    |
| Prurido no nariz               | $1,5 \pm 0,1$       | $2,0 \pm 0,4$    |
| Escore total                   | $8,2 \pm 0,6$       | $7,9 \pm 0,5$    |
| <b>Sintomas de ponto final</b> |                     |                  |
| Nariz escorrendo               | $1,5 \pm 0,2^{a,b}$ | $2,2 \pm 0,3$    |
| Espirros                       | $1,4 \pm 0,3^{a,b}$ | $1,5 \pm 0,1$    |
| Nariz entupido                 | $1,2 \pm 0,1^{a,b}$ | $1,8 \pm 0,1$    |
| Prurido no nariz               | $1,1 \pm 0,2^{a,b}$ | $2,1 \pm 0,2$    |
| Escore total                   | $5,2 \pm 0,3^{a,b}$ | $7,8 \pm 0,2$    |

<sup>a</sup> Comparado com grupo placebo,  $p < 0,05$ .

<sup>b</sup> Comparado com sintoma do momento basal,  $p < 0,05$ .

comparação com os escores do grupo placebo e de sintomas do momento basal (tabela 1).

### Diminuição dos níveis de proteína de F4P e BTG séricos durante o tratamento de ITLS

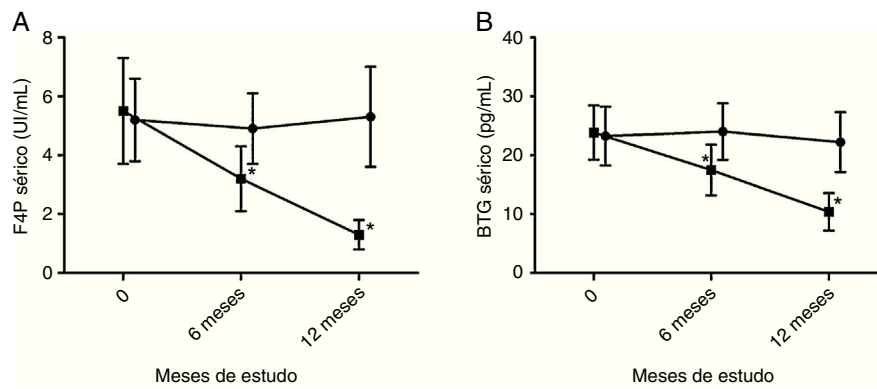
O F4P sérico e a expressão da proteína BTG durante o tratamento de ITLS foram significativamente menores do que aqueles no grupo placebo após seis meses de tratamento (F4P  $3,2 \pm 1,1$  vs.  $4,9 \pm 1,2$  UI/mL; BTG  $17,4 \pm 4,3$  vs.  $23,2 \pm 5,1$  UI/mL) e essa tendência mantida por pelo menos um ano (F4P  $1,3 \pm 0,5$  vs.  $5,3 \pm 1,7$  UI/mL; BTG  $10,5 \pm 3,2$  vs.  $21,6 \pm 4,8$  UI/mL) (fig. 1 A e B).

### Relação entre os escores dos sintomas e F4P sérica e níveis de proteína BTG

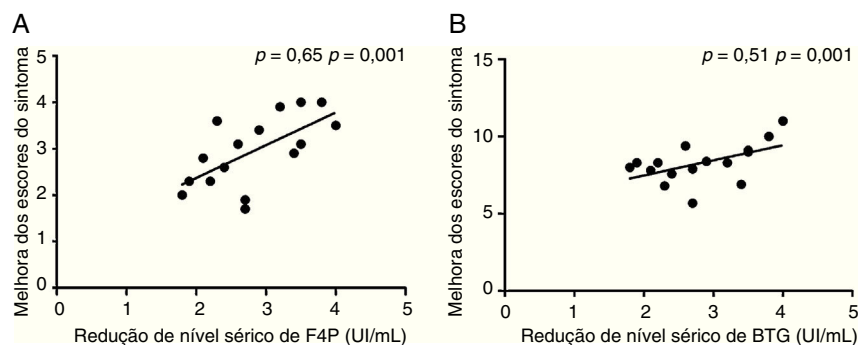
Para explorar o efeito da ativação plaquetária no escore de sintomas, analisamos a relação entre os escores dos sintomas e F4P sérico e níveis de proteína BTG no grupo de ITLS. Após um ano de tratamento, a melhoria dos escores de sintomas foi positivamente relacionada com a redução do F4P sérico e dos níveis de proteína BTG ( $p = 0,65$ ;  $p = 0,001$ ;  $p = 0,51$ ;  $p = 0,002$ ) (fig. 2).

## Discussão

As plaquetas podem desempenhar um papel importante no processo inflamatório alérgico, porque são fonte rica de materiais biologicamente ativos, capazes de induzir ou aumentar as respostas inflamatórias alérgicas.<sup>9-12,3</sup> Foi demonstrado que esses materiais estão armazenados em grânulos alfa e que são quimiocinas, tais como F4P e BTG.



**Figura 1** Expressão de F4P sérico e da proteína BTG reduzida após ITLS após seis meses em comparação com o grupo controle e nível basal com significância. A diminuição foi mantida pelo menos um ano sem rebote (\*  $p < 0,05$ , comparação entre os dois grupos e o momento basal; ●, representa grupo placebo; ■ representa grupo ITLS).



**Figura 2** Relação positiva entre melhoria dos escores dos sintomas e redução de níveis séricos de F4P de proteínas de BTG após um ano de ITLS grupo de tratamento ativo (A e B).

No entanto, o papel de ativação de plaquetas em ITSL não era claro, especialmente em crianças.

Nossos resultados mostraram que F4P e nível BTG diminuíram significativamente após seis meses de ITLS e a melhoria foi mantida por pelo menos um ano. Apesar de a redução do nível de F4P e BTG ter sido observada após três meses de tratamento, nenhuma diferença estatística foi encontrada. Além disso, os escores de melhoria dos sintomas após um ano de ITLS foram positivamente relacionados com a diminuição do nível de F4P e BTG. Esses resultados sugeriram que a ITLS possa modificar processos alérgicos por inibição da função das plaquetas, pelo menos parcialmente.

Compatível com nossos resultados, Kowal<sup>13</sup> observou um aumento da ativação plaquetária intravascular em pacientes com asma alérgica a APD e submetidos a provocação alérgica brônquica. A relação entre as mudanças de marcadores de ativação de plaquetas e o desenvolvimento de resposta asmática tardia sugere que a ativação de plaquetas dentro da circulação é crucial para o desenvolvimento da inflamação alérgica crônica. Além disso, Knauer<sup>14</sup> demonstrou mudanças significativas no nível de F4P de pacientes com asma induzida pelo pólen após provocação brônquica com extrato de ervas.

No estudo de Alicja,<sup>15</sup> verificou-se que o nível plasmático de F4P no paciente fora da estação de pólen foi significativamente menor em comparação com a estação e não diferiu de maneira significativa em comparação com indivíduos saudáveis. Por outro lado, em seus outros dois estudos,<sup>16,17</sup>

os resultados sugeriram que os níveis de F4P e BTG não foram significativamente diferentes entre os pacientes e indivíduos saudáveis após imunoterapia. Notavelmente, a imunoterapia em seus dois estudos dura apenas seis meses e uma amostra de sangue foi coletada imediatamente após a injeção de dose máxima. No nosso estudo, o tratamento com ITSL durou pelo menos um ano e o soro foi amostrado em pontos de tempo diferentes. Observamos que a diminuição de F4P sérica e o nível de BTG duraram pelo menos um ano. A diferença entre o nosso estudo e o de Alicja sugere a importância do período de manutenção em imunoterapia. No entanto, o pequeno número de pacientes é uma das limitações do nosso estudo. São necessários estudos futuros com grande amostra para esclarecer o papel do F4P e da BTG na ITLS. Além disso, a mudança de F4P e BTG no lavado nasal antes e depois de ITLS deve ser discutida futuramente, para explorar o efeito local da ativação plaquetária no mecanismo da RA e ITLS.

## Conclusão

Nosso estudo foi o primeiro a mostrar as mudanças na atividade plaquetária *in vivo* em crianças com RA durante ITLS. Os nossos resultados podem indicar que a inibição da ativação de plaquetas dentro da circulação sistêmica é um mecanismo importante durante ITLS. A ITLS pode melhorar sintomas e inibir parcialmente a ativação plaquetária.

## Padrões éticos

Os autores afirmam que todos os procedimentos que contribuíram para este trabalho estão em conformidade com os padrões éticos das diretrizes nacionais e institucionais relevantes sobre experimentação humana e com a Declaração de Helsinque de 1975, revisada em 2008.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Referências

1. Frew AJ. Sublingual immunotherapy. *N Engl J Med*. 2008;35:2259–64.
2. Wilson DR, Lima MT, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2005;60:4–12.
3. Pitchford SC, Page CP. Platelet activation in asthma: integral to the inflammatory response. *Clin Exp Allergy*. 2006;36:399–401.
4. Kasperska-Zajac A, Rogala B. Platelet activation during allergic inflammation. *Inflammation*. 2007;30:161–6.
5. Page C, Pitchford S. Platelets and allergic inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2014;44:901–13.
6. Duarte D, Taveira-Gomes T, Sokhatska O, Palmares C, Costa R, Negrao R, et al. Increased circulating platelet microparticles as a potential biomarker in asthma. *Allergy*. 2013;68:1073–5.
7. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63 Suppl.:8–160.
8. Carr W, Bernstein J, Lieberman P, Meltzer E, Bachert C, Price D, et al. A novel intranasal therapy of azelastine with fluticasone for the treatment of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:1282–9.
9. Palikhe S, Palikhe NS, Kim SH, Yoo HS, Shin YS, Park HS. Elevated platelet activation in patients with chronic urticaria: a comparison between aspirin-intolerant and aspirin-tolerant groups. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;113:276–81.
10. Johansson MW, Han ST, Gunderson KA, Busse WW, Jarjour NN, Mosher DF. Platelet activation, P-selectin, and eosinophil beta1-integrin activation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:5498–507.
11. Benton AS, Kumar N, Lerner J, Wiles AA, Foerster M, Teach SJ, et al. Airway platelet activation is associated with airway eosinophilic inflammation in asthma. *J Investig Med*. 2010;58:987–90.
12. Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Ueda E, Masuda K, Kishimoto S. Elevated platelet activation in patients with atopic dermatitis and psoriasis: increased plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4. *Allergol Int*. 2008;57:391–6.
13. Kowal K, Pampuch A, Kowal-Bielecka O, DuBuske LM, Bodzenta-Lukaszyk A. Platelet activation in allergic asthma patients during allergen challenge with *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy*. 2006;36:426–32.
14. Knauer KA, Linchtenstein LM, Adkinson NF, Fish JE. Platelet activation during antigen-induced airway reactions in asthmatic subjects. *N Engl J Med*. 1981;304:1404–7.
15. Kasperska-Zajac A, Brzoza Z, Rogala B. Seasonal changes in platelet activity in pollen-induced seasonal allergic rhinitis and asthma. *J Asthma*. 2008;45:485–7.
16. Kasperska-Zajac A, Brzoza Z, Rogala B. Effect of allergen-specific immunotherapy on plasma level of platelet factor 4 (PF-4) and beta-thromboglobulin (beta-TG), platelet activation markers in patients with house dust mite allergy. *Vaccine*. 2007;25:3595–8.
17. Kasperska-Zajac A, Brzoza Z, Rogala B. Effect of allergen-specific immunotherapy on platelet secretory activity in patients with grass-pollen allergy. *Vaccine*. 2006;24:6990–3.